

镜湖萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*) 种群遗传多样性的季节变化

项贤领, 席贻龙*, 胡好远

(安徽师范大学生命科学学院, 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室, 芜湖 241000)

摘要 运用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术研究了于 2005 年春季和夏季采自芜湖市镜湖的萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*) 种群基因组 DNA 多态性。从 44 个随机引物中筛选出 10 个谱带清晰、重复性好的引物。10 个引物共检测到 76 个位点, 其中 65 个位点显多态性, 多态位点比例 (P) 为 85.5%。对 RAPD 扩增结果进行聚类分析, 基于遗传距离指数构建了萼花臂尾轮虫的 UPGMA 和 ME 系统树。经计算, 各克隆平均遗传距离指数为 0.5219, 春季种群内遗传距离指数 (0.4416) 大于夏季种群内遗传距离指数 (0.4304), 两季节种群间遗传距离指数为 0.6010, 明显大于季节种群内遗传距离指数。16 个克隆分别聚在 2 个主要族群中, 在 UPGMA 系统树中, 春季种群和夏季种群明显分聚在两个主要支系中, 而在 ME 树中, 除了夏季 Su2 克隆和春季种群聚到一个支系外, 其它夏季种群则聚在一个独立支系中。上述结果表明, 春季种群和夏季种群在遗传上具有较大的差异, 镜湖萼花臂尾轮虫种群存在着明显的季节更替, 而 Su2 克隆可能是春季和夏季种群间的过渡。

关键词 萼花臂尾轮虫; 季节种群; DNA 多态性; RAPD; 遗传距离

文章编号: 1000-0933 (2007) 06-2443-06 中图分类号: Q178 Q958.8 Q959.181 文献标识码: A

Seasonal changes in the genetic diversity of *Brachionus calyciflorus* population in Lake Jinghu

XIANG Xian-Ling, XI Yi-Long*, HU Hao-Yuan

College of Life Sciences, Anhui Normal University; Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui Province, Wuhu, Anhui 241000, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (6) 2443 ~ 2448.

Abstract : Genetic diversity of spring and summer populations of *Brachionus calyciflorus* collected from Lake Jinghu in Wuhu City was analyzed using RAPD method. 10 primers that produced repeatable and discernible bands were chosen from 44 random primers. Among the total of 76 loci detected, 65 loci (85.5%) were polymorphic. UPGMA and ME dendrograms of *B. calyciflorus* were constructed by clustering the amplified bands on the basis of the index of genetic distance. The average genetic distance among all samples was 0.5219. The genetic distance within summer population (0.4304) was shorter than that within spring population (0.4416). The genetic distance (0.6010) between the two seasonal populations was longer than that within either seasonal population. The two trees both showed that the sixteen

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30499341, 30270221); 安徽省优秀青年基金资助项目 (04043050); 安徽省教育厅自然科学基金资助项目 (2004sys003); 安徽省重点实验室专项基金资助项目

收稿日期: 2006-05-20; 修订日期: 2007-01-19

作者简介: 项贤领 (1978 ~), 男, 安徽肥东人, 博士生, 主要从事浮游动物生态学。E-mail: xiangxianling@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ylx1965@yahoo.com.cn

Foundation item : The project was financially supported by Natural Science Foundation of China (No. 30499341, 30270221), Excellent Youth Foundation in Anhui Province (No. 04043050) and Natural Science Foundation of Educational Committee of Anhui Province (No. 2004sys003), and the foundation of Provincial Key Laboratory of Conservation and Utilization for Important Biological Resource in Anhui.

Received date 2006-05-20; **Accepted date** 2007-01-19

Biography XIANG Xian-Ling, Master, mainly engaged in zooplankton ecology. E-mail: xiangxianling@163.com

samples were obviously divided into different clades. In UPGMA trees ,the spring and summer populations were divided into two clades. In ME trees ,all the summer samples except Su2 were separated as an independent clade. The results indicated that there is an obvious genetic difference between the two seasonal populations and a seasonal alternation in *B. calyciflorus* population collected from Lake Jinghu ,and the sample Su2 may be an interim population.

Key Words : *Brachionus calyciflorus* ;seasonal population ;DNA polymorphism ;RAPD ;genetic distance

水环境的季节性变化对水生生物的生理生化具有较大影响。温度和饵料等环境因子随季节而变化使得鱼类^[1~3]和甲壳类^[4,5]动物蛋白酶的活力和组成相应地也会发生一定的变化。由于蛋白质的表达和基因之间呈非线性关系,且蛋白质组具有多样性和可变性,同一机体的不同细胞中,蛋白质的种类和数量是各不相同的,即使是同一种细胞,在不同时期、不同生理条件下,其蛋白质组都处在不断变化之中。因此,水环境的季节性变化所引起的水生生物生理生化的变化究竟是由于基因水平上的差异导致的,还是由于温度等环境因子的改变而引起蛋白酶活力的变化造成的,目前仍有待于进一步的研究。

轮虫是各类水体中广泛分布的一类浮游动物,在自然水生态系统的物质循环和能量传递过程中具有重要的作用。为探明轮虫种群遗传结构的季节变化,江东海等^①运用等位酶电泳技术和实验种群生态学研究方法分析了于2005年春季和夏季采自芜湖市镜湖的萼花臂尾轮虫种群,发现两季节种群间存在着明显的遗传差异和生态分化,但它们在DNA水平上的差异如何却不得而知,而这恰是国际轮虫学界有关轮虫种群季节变化研究中倍受关注的问题之一。

随机扩增多态DNA(Random Amplified Polymorphic DNA,RAPD)技术具有检测快速、操作简便、灵敏度高、成本低等特点,已被广泛应用于遗传多样性^[6~8]、物种分化以及种群遗传结构空间变异^[9]等研究。然而将RAPD技术应用于轮虫种群季节差异的研究尚未见报道。本文以各类水体中广泛分布的萼花臂尾轮虫为对象,运用RAPD技术对采自芜湖市镜湖春、夏两个季节的轮虫种群进行了基因组DNA多态性研究,旨在从DNA水平上探讨其遗传多样性和种群季节差异。

1 材料和方法

1.1 轮虫的采集和培养

实验用萼花臂尾轮虫于2005年春季和夏季采自芜湖市镜湖。采样时,在湖区设8个采样点。样品采集后,实验室内在(25±1)℃、自然光照(光照强度约130lx,L:D=14:10)条件下对轮虫进行“克隆”培养。培养液采用Gilbert^[10]配方(pH=7.3),所用饵料为HB-4培养基培养的、处于指数增长期的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)培养时间在1个月以上。当各“克隆”轮虫的个体数达1000只以上时用轮虫培养液过滤冲洗,饥饿24h后用70%酒精固定保存。本研究开始前,分别由春季和夏季的克隆群中随机选取了7个和9个克隆。

1.2 总DNA的提取

用玻璃粉法提取基因组DNA^[11]。具体方法为:离心获得轮虫样品,ddH₂O冲洗2次,置1.5ml Eppendorf管中,加500μl DNA提取缓冲液(0.5% SDS,25mmol/L EDTA,25mmol/L NaCl,100mmol/L Tris-HCl,pH8.0)和20μl 蛋白酶K(20μg/ml),置60℃水浴2h,加500μl 8mol/L 预热后的硫氰酸胍和40μl (1:1)的洁净玻璃粉乳液,混匀后置37℃水浴1h,不时摇动,取出,4000r/min离心2min,弃去上清液,沉淀用70%冰乙醇洗2次,再用丙酮洗1次,置真空干燥机中干燥。加TE(pH8.0)40μl,置56℃水浴30min,取出,8000r/min离心2min,吸上清液,置-20℃保存备用。

1.3 RAPD 扩增反应及检测

RAPD 扩增反应在 MJ Research 公司生产的 PTC-100TM 扩增仪上进行,凝胶成像系统为 Ultra-Violet

① 江东海,席贻龙,刘胜国. 镜湖萼花臂尾轮虫种群遗传结构和生殖参数的季节变化. 待发表

Products Ltd. Cambridge UK ,DNA Marker 使用宝生物工程 (大连)有限公司的 DL2000 ,其它试剂均购于上海博之鑫公司。反应体系的总体积为 25μl ,包括 1 × Buffer ,0. 2mmol/L dNTP ,1. 5μmol/L 随机引物 ,2 mmol/L Mg²⁺ ,DNA 模板 2μl ,1U 的 Taq 酶 ,超纯水补至 25μl。扩增程序如下 94℃ 预变性 6min ,94℃ 变性 1min ,35℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 2min ,共 35 个循环。最后 72℃ 延伸 10min ,4℃ 保存 10h ,终止反应。每次反应设空白对照。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶 (含 0. 5μg/ml EB)中电泳 ,缓冲液为 1 × TBE ,电泳时间约 1. 5h ,在凝胶成像系统中进行观察、拍照并分析。

1.4 数据处理及分析

根据记录和电泳照片计算清晰的扩增带 ,利用 Nei & Li 的公式^[21]计算遗传距离指数 :
共享度
$$F = 2 \times N_{xy} / (N_x + N_y)$$

式中 N_{xy} 表示样本 x 和 y 之间共有的 DNA 扩增片段数目 , N_x 为样本 x 具有的 DNA 扩增片段数目 , N_y 为样本 y 具有的 DNA 扩增片段数目。
再根据片段共享度来计算遗传距离指数 :

$$D = 1 - F$$

将遗传距离指数排成矩阵输入分子进化遗传分析软件 MEGA (version 3. 0)程序中 ,应用 UPGMA 法和 ME 法进行聚类分析 ,得到两个系统树。根据扩增带 ,统计位点总数、多态位点数和每个多态位点在群体中的分布频率 ,群体的多态位点百分率 $P = \text{该群体的多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 RAPD 图谱分析

本研究使用了 A、B、I、S、T 和 K 共 6 个系列 60 个 10bp 随机引物 (上海生工生物工程技术有限公司) 。对这些引物进行筛选 ,选择其中产生丰富 DNA 扩增片段的 44 个引物正式扩增。筛选的 44 个引物中有 10 个引物扩增出的 RAPD 谱带清晰、重复性好 ,具多态性。扩增出的 DNA 条带数目从 1 条到 8 条 ,平均每个引物在每个样本上产生 4 条带。表 1 列出了所有 10 个随机引物的序列 ,图 1 示引物 I10 和 I13 扩增产物的电泳图。

表 1 10 个随机引物的 DNA 序列和扩增带数
Table 1 Sequences and numbers of amplified bands of 10 random primers

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequences	扩增带数 Nos. of bands	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequences	扩增带数 Nos. of bands
I04	CCGCCTAGTC	2-4	I13	CTGGGGCTGA	1-6
I06	AAGGCGGCAG	3-7	S05	TTTGGGGCCT	1-6
I07	CAGCGACAAG	2-8	S06	GATACCTCGG	2-5
I09	TGGAGAGCAG	1-8	S09	TCCTGGTCCC	3-8
I10	ACAACGCGAG	1-5	T02	GGAGAGACTC	2-6

2.2 多态性分析与遗传距离指数

10 个引物共检测到 76 个位点 ,其中 65 个位点显多态性 ,多态位点比例 (P) 为 85. 5%。每个引物均扩增出多态片段 ,多态位点百分率因引物而异 ,也因季节种群而异。表 2 列出了季节种群内和季节种群间遗传距离指数 ,各克隆平均遗传距离指数为 0. 5219 ,春季种群内遗传距离指数 (0. 4416)大于夏季种群内遗传距离指数 (0. 4304) ,两季节种群间遗传距离指数 (0. 6010) 明显大于季节种群内遗传距离指数。

2.3 聚类分析

对 RAPD 扩增结果进行聚类分析 ,基于遗传距离指数构建了萼花臂尾轮虫的 UPGMA (图 2)和 ME 系

表 2 季节种群内和季节种群间遗传距离指数
Table 2 The index of genetic distance between and within the two seasonal populations

季节种群 Seasonal populations	春季 Spring	夏季 Summer
春季 Spring	0. 4416	
夏季 Summer	0. 6010	0. 4304

统树 (图 3)。16 个克隆分别聚在 2 个主要族群中,在 UPGMA 系统树中,春季克隆和夏季克隆明显分聚在两个主要支系中;而在 ME 树中,除了夏季 Su2 克隆和所有的春季克隆聚到一个支系外,其它夏季克隆则聚在一个独立支系中。

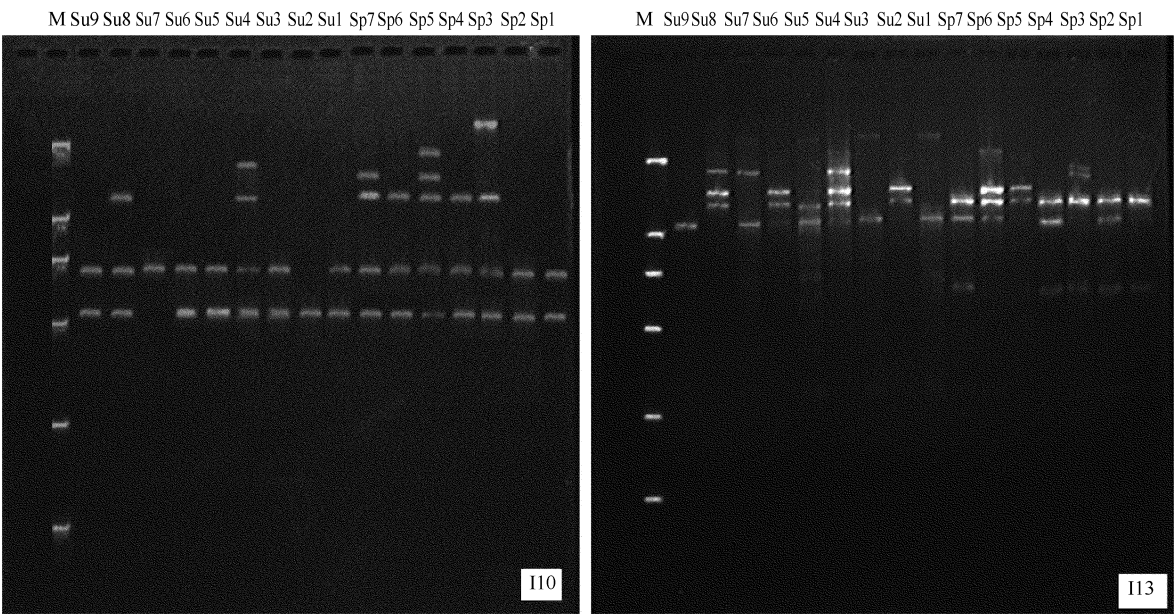


图 1 引物 I10 和 I13 的扩增图谱
Fig. 1 Amplification profiles generated by primers I10 & I13

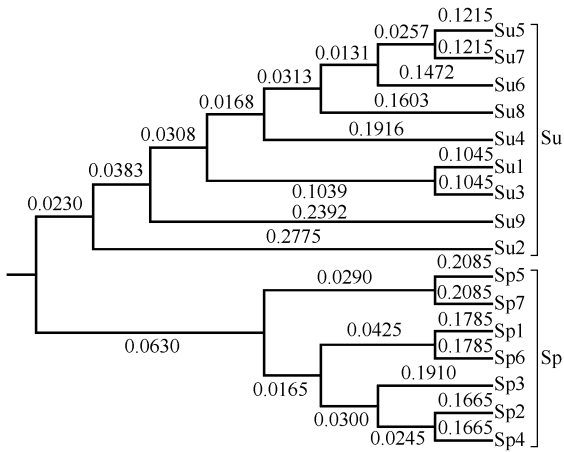


图 2 萼花臂尾轮虫 16 个克隆的 UPGMA 系统树
Fig. 2 UPGMA dendrogram of 16 clones of *B. calyciflorus*

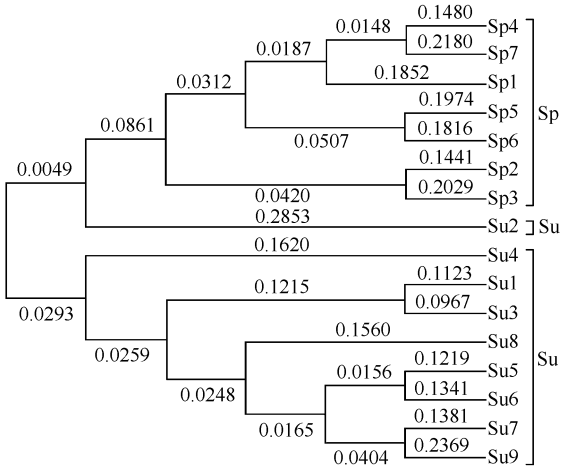


图 3 萼花臂尾轮虫 16 个克隆的 ME 系统树
Fig. 3 ME dendrogram of 16 clones of *B. calyciflorus*

3 讨论

已有的研究结果表明,由于水环境中的物理、化学和生物等因子季节性变化的影响,栖息于温度等环境条件较均一的浅水湖泊或池塘中的大肚须足轮虫 (*Euchlanis dilatata*)、盖氏晶囊轮虫 (*Asplanchna girodi*)和褶皱臂尾轮虫 (*B. plicatilis*)等种群内的部分克隆间不仅存在着生态特化,而且具有明显的遗传差异^[13~16]。此外,某一时期不同基因型的克隆群可共存于同一水体中(即“克隆共存”),另一时期则存在着不同基因型的克隆

群的交替出现 (即“克隆替代”)^[7], 这表明轮虫种群遗传结构存在着季节变化。本研究中,在所检测到的 76 个位点中 65 个位点显多态性,多态位点比例 (P) 为 85.5%,可见采自镜湖的萼花臂尾轮虫不同季节克隆间遗传差异较大,遗传多样性也较丰富。通过 UPGMA 法构建系统树发现,春季种群和夏季种群被明显分为两个独立的进化枝,而 ME 树中,采集于夏季的 Su2 却聚类在春季克隆群支系中。由此可见,本研究在等位酶分析^①的基础上,首次在 DNA 水平上发现镜湖萼花臂尾轮虫春季种群和夏季种群在遗传上具有较大的差异,镜湖萼花臂尾轮虫种群存在着明显的季节更替 (“克隆替代”),而 Su2 克隆可能为春季和夏季种群间的过渡。

镜湖萼花臂尾轮虫种群遗传结构存在着明显的季节更替,可能与轮虫种群本身所存在的季节更替具有密切的关系。Liu 等^[8]发现,春末 (3 月底) 轮虫种群在 19℃ 的水体中具有较高的混交雌体百分率,导致了轮虫种群的急剧减小和随后的几近消失。夏季,由于水体中现存的轮虫个体和由底泥中的休眠卵孵化产生的轮虫个体的孤雌生殖导致轮虫种群出现较高的密度。在此过程中,春季种群中原有的部分个体的消失和夏季种群中新出现的部分个体的加入必然会导致种群遗传结构出现明显的季节更替。

动物基因位点频率在不同季节和年间存在差异已有一些报道。在本研究中,各引物所反映的季节多态性变化趋势也略有不同,这可能是由于各引物所结合的位点受到的选择压力不同所致^[9]。周虞灿^[20]也发现小家鼠 (*Mus musculus*) 的血红蛋白 (Hb) 共有 6 种多态型,但所有多态型并非在每一个季节都出现。

与过去的蛋白或酶多态方法相比,采用 RAPD 技术的确能够检测到大量的遗传多态位点,这样的方法对于研究种群时空异质性是比较合适的,因为种群动态研究往往需要分析大量的样品和较多的基因位点。

References :

[1] Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature , seasons and diet in roach , *Rutilus rutilus* and *Rucld scardinius erythrophthalmus* I . amylase. J. Fish Biol. , 1978 , 14 : 565 — 572.

[2] Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature , seasons and diet in roach , *Rutilus rutilus* and *Rucld scardinius erythrophthalmus* II . protease. J. Fish Biol. , 1979 , 15 : 373 — 379.

[3] Chen P J , Wang Z G , Zheng S L. Comparison between activity of digestive enzymes in *Pagrosomus major* larva , juvenile and young fish in summer and winter. Acta Oceanologica Sinica , 1998 , 20 (5) : 90 — 92.

[4] Hassett R P. Seasonal changes in feeding rate , digestive enzyme activities and assimilation efficiency of *Calanus pacificus*. Mar. Eco. Pro. Ser. , 1990 , 62 (3) : 203 — 210.

[5] Tang H , Li S J. Factors influencing the digestive enzyme activity of copepods. Chinese Journal of Ecology , 1994 , 13 (1) : 45 — 50.

[6] Zhang D X. Molecular ecology. In : Ge F. Modern ecology. Beijing : Science Press , 2002. 7 — 31.

[7] Sun Y H , Liu S Y , Peng Z , *et al.* Genetic structure of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) by mtDNA and RAPD markers. Acta Hydrobiologica Sinica , 2003 , 27 (3) : 248 — 252.

[8] Zhu X P , Du H J , Zhou L , *et al.* Genetic diversity analysis of Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesh*) by RAPD. Acta Hydrobiologica Sinica , 2005 , 29 (2) : 167 — 171.

[9] Meng Z N , Zhuang Z M , Jin X S , *et al.* Genetic diversity in small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis*) by RAPD analysis. Biodiversity Science , 2003 , 11 (3) : 197 — 203.

[10] Gilbert J J. Mictic female production in rotifer *Brachionus calyciflorus*. J. Exp. Zool. , 1963 , 153 : 113 — 124.

[11] Hao J S , Yang Q , Li C X , *et al.* Molecular phylogeny of Lophotrochozoa based on 18S rRNA gene sequences-with comment on the phylogenetic position of Bryozoa. Journal of Genetics and Molecular Biology , 2003 , 14 (2) : 64 — 72.

[12] Nei M , Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. , 1979 , 76 : 5269 — 5273.

[13] King C E. Adaptation of rotifers to seasonal variation. Ecology , 1972 , 53 : 408 — 418.

① 江东海 , 席贻龙 , 刘胜国. 镜湖萼花臂尾轮虫种群遗传结构和生殖参数的季节变化. 待发表

[14] King C E. Genetics of reproduction , variation and adaptation in rotifers. Archi. Hydrobiol. Beih. ,1977 ,8 :187 —201.

[15] King C E ,Zhao Y. Coexistence of rotifer *Branchionus plicatilis* clones in Soda Lake , Nevada. Hydrobiologia ,1987 ,147 :57 —64.

[16] Zhao Y ,King C E. Ecological genetics of the rotifer *Branchionus plicatilis* in Soda Lake , Nevada , USA. Hydrobiologia ,1989 ,185 :175 —181.

[17] King C E ,Serra M. Seasonal variation as a determinant of population structure in rotifers reproducing by cyclical parthenogenesis. Hydrobiologia ,1998 ,387/388 :361 —372.

[18] Liu S G ,Xi Y L ,Jiang D H. Temporal Differences in Reproductive Characteristics of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera) from Lake Jinghu , China. Journal of Freshwater Ecology ,2006.

[19] Wang Y Q ,Zhang Z B ,Wang Y S , *et al.* Seasonal changes in the genetic diversity of rat-like Hamster (*Cricetulus triton*) populations. Acta Zoologica Sinica ,2002 ,48 (6) :733 —740.

[20] Zhou Y C. Temporal dynamics of the hemoglobin polymorphism in fluctuating population of feral house mouse. Acta Theriologica Sinica ,1983 ,3 (1) :65 —71.

参考文献：

[3] 陈品健 ,王重刚 ,郑森林. 夏、冬两季真鲷仔、稚、幼鱼消化酶活性的比较研究. 海洋学报 ,1998 20 (5) :90 ~92.

[5] 汤鸿 ,李少菁. 桡足类消化酶活力的影响因子. 生态学杂志 ,1994 ,13 (1) :45 ~50.

[6] 张德兴. 分子生态学. 见 :戈峰主编. 现代生态学. 北京 :科学出版社 ,2002.7 ~31.

[7] 孙玉华 ,刘思阳 ,彭智 ,等. 中国胭脂鱼种群的遗传分析. 水生生物学报 ,2003 27 (3) :248 ~252.

[8] 朱新平 ,杜合军 ,周莉 ,等. 乌龟遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报 ,2005 29 (2) :167 ~171.

[9] 蒙子宁 ,庄志猛 ,金显仕 ,等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性 ,2003 ,11 (3) :197 ~203.

[19] 汪永庆 ,张知彬 ,王玉山 ,等. 大仓鼠种群遗传多样性的季节性变化. 动物学报 ,2002 48 (6) :733 ~740.

[20] 周虞灿. 小家鼠血红蛋白多态型与种群密度的关系. 兽类学报 ,1983 3 (1) :65 ~71.